

**ANALES**  
**DE LA**  
**REAL ACADEMIA NACIONAL**  
**DE FARMACIA**  
**PUBLICACIÓN TRIMESTRAL**

AÑO LXXIII	2007	Núm. 2
------------	------	--------

ISSN - 1697-4271

ÓRGANO RECTOR  
LA COMISIÓN DE PUBLICACIONES  
DIRECTOR:

Coden - **ARAFAY**

Dr. ANTONIO LUIS DOADRIO VILLAREJO  
EDITORA CIENTÍFICA:  
Dra. M.<sup>a</sup> TERESA MIRAS PORTUGAL

**SUMARIO**

*Revisiones*

- Efecto del fungicida procloraz-manganeso en la verticiliosis del champiñon cultivado: **Concepción García Mendoza** . 403
- El suelo: integración de componentes minerales y orgánicos: **Juana González Parra** ..... 419

*Artículos Originales*

- Las determinaciones de glutamato utilizando Amplex Red Glutamic Acid Assay están afectadas por el agonista P2X BzATP: **Patricia Marín-García, Jesús Sánchez-Nogueiro, David León** ..... 441
- Efecto de la subnutrición materna sobre el desarrollo, crecimiento y funcionalidad de las células  $\beta$  pancreáticas en el feto: implicación del sistema de IGFs: **Elisa Fernández Millán, M. Ángeles Martín Arribas, Carmen Álvarez Escolá** ..... 453

Aplicación en QSPR del parámetro topográfico $V_{c3}$ a sustancias derivadas de la benceno sulfonamida: <b>Edward Cornwall</b> .....	493
--	-----

### *Sesiones*

Biotecnología blanca e industria farmacéutica: <b>José María Sánchez Montero</b> .....	501
Ecto-nucleotidasas, propiedades moleculares e impacto funcional: <b>Herbert Zimmermann, Santosh K. Mishra, Varsha Shukla, David Langer, Kristine Gampe, Ivette Grimm, Jasmin Delic, Norbert Braun</b> .....	537

### *Necrológica*

Sesión Necrológica en Homenaje al Excmo. Señor Don Emilio Fernández-Galiano: <b>Jesús Izco Sevillano, Gonzalo Giménez Martín, Juan Ramón Lacadena Calero, Juan Manuel Reol Tejada</b> .....	567
---	-----

### INFORMACIÓN ACADÉMICA

— <i>Sesiones Científicas</i> .....	603
— <i>Sesión Científica Especial: Presentación del Diccionario Terminológico de las Ciencias Farmacéuticas</i> .....	606
— <i>Noticias</i> .....	637
— <i>Normas para la presentación de originales</i> .....	641

Depósito legal: M. 3.869-1958

---

Impreso en Realigraf, S. A - Pedro Tezano, 26. 28039 Madrid

**ANALES**  
**DE LA**  
**REAL ACADEMIA NACIONAL**  
**DE FARMACIA**  
**PUBLICACIÓN TRIMESTRAL**

AÑO LXXIII	2007	Núm. 2
------------	------	--------

ISSN - 1697-4271

ÓRGANO RECTOR  
 LA COMISIÓN DE PUBLICACIONES  
 DIRECTOR:

Coden - **ARAFAY**

Dr. ANTONIO LUIS DOADRIO VILLAREJO  
 EDITORA CIENTÍFICA:  
 Dra. M.<sup>a</sup> TERESA MIRAS PORTUGAL

**SUMMARY**

*Review Articles*

- The effect of the fungicide prochloraz-manganese on the verticillium disease of the cultivated white mushroom:  
**Concepción García Mendoza** ..... 403
- The soil: Integration of mineral and organic components:  
**Juana González Parra** ..... 419

*Original Articles*

- Glutamate determinations using Amplex Red Glutamic Acid Assay are affected by P2X agonist BzATP: **Patricia Marín-García, Jesús Sánchez-Nogueiro, David León** ..... 441
- Effect of maternal undernutrition on fetal pancreatic  $\beta$  cell development, growth and functionality: involvement of the IGF system: **Elisa Fernández Millán, M. Ángeles Martín Arribas, Carmen Álvarez Escolá** ..... 453

Application of $V_{c3}$ topographic QSPR parameters to benzene sulfonamida substances derivatives: <b>Edward Cornwell</b> .....	493
---	-----

### *Sessions*

White biotechnology and pharmaceutical industry: <b>José María Sánchez Montero</b> .....	501
Ecto-nucleotidases, molecular properties and functional impact: <b>Herbert Zimmermann, Santosh K. Mishra, Varsha Shukla, David Langer, Kristine Gampe, Ivette Grimm, Jasmin Delic, Norbert Braun</b> .....	537

### *Obituary*

Obituary session in honor of Excmo. Sr. D. Emilio Fernández-Galiano: <b>Jesús Izco Sevillano, Gonzalo Giménez Martín, Juan Ramón Lacadena Calero, Juan Manuel Reol Tejada</b> .....	567
---	-----

### ACADEMIC NEWS

— <i>Scientific Sessions</i> .....	603
— <i>Special Scientific Session: Pharmaceutical Science Terminological Dictionary Presentation</i> .....	606
— <i>News</i> .....	637
— <i>Instructions to Authors</i> .....	641

## Efecto del fungicida procloraz-manganeso en la verticiliosis del champiñón cultivado

Recibido el 1 de marzo de 2007

CONCEPCIÓN GARCÍA MENDOZA\*

*Académica Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia*

*Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, 28040 Madrid*

### RESUMEN

El procloraz-manganeso, fungicida usado rutinariamente para controlar la verticiliosis o «mole seca» de los cultivos comerciales de champiñón producida por el hongo Hifomiceto *Verticillium fungicola*, en la DL<sub>50</sub> calculada para el patógeno, inhibe parcialmente la síntesis de proteínas de sus paredes celulares, reestructurando al mismo tiempo, ciertos polisacáridos neutros de las mismas paredes celulares. El hongo hospedador, el Basidiomiceto *Agaricus bisporus* cultivado para la alimentación humana, tratado con su correspondiente DL<sub>50</sub> de procloraz-manganeso, modifica también parcialmente las proteínas y determinados polisacáridos de las paredes celulares de su micelio vegetativo. Sin embargo las paredes celulares del micelio agregado (carpóforos) de *A. bisporus*, utilizando la citada DL<sub>50</sub> o la DL<sub>50</sub> x1000 de dicho fungicida, reestructuran de forma algo distinta sus componentes mayoritarios de acuerdo con la dosis empleada. El efecto progresivo del procloraz-manganeso se manifiesta también inhibiendo parcialmente la producción industrial de champiñón y modificando ligeramente la morfología de la superficie de los carpóforos.

**Palabras clave:** Fungicida procloraz-manganeso.—*Verticillium fungicola*.—*Agaricus bisporus*.—Pared celular.—Inhibición parcial de proteínas.—Reestructuración de polisacáridos.

\* E-mail: [cgm@cib.csic.es](mailto:cgm@cib.csic.es)

## ABSTRACT

**The effect of the fungicide prochloraz-manganese on the verticillium disease of the cultivated white mushroom**

The prochloraz-manganese, fungicide routinely used to control the verticillium disease or «dry bubble» of the white mushroom commercial cultures, produced by the fungus Hyphomycete *Verticillium fungicola*, in the presence of the LD<sub>50</sub> calculated for the pathogen, partially inhibits the protein synthesis of its cell walls, while at the same time, restructuring certain neutral polysaccharides of the same cell walls. The host fungus, the Basidiomycete *Agaricus bisporus* cultivated for human nutrition, treated with its corresponding LD<sub>50</sub> of prochloraz-manganese also partially modifies its vegetative mycelial cell walls with regard to the proteins and determined polysaccharides. However the aggregated mycelial cell walls of the *A. bisporus* fruit bodies using the cited LD<sub>50</sub> or the LD<sub>50</sub>x1000 of the same fungicide, restructure their major components in a rather distinct way according to the amounts employed. The progressive effect of the prochloraz-manganese is also evidenced by the partial inhibition of the industrial production of white mushrooms and the slight modifications of the surface morphology of the fruit bodies.

**Key words:** Fungicide prochloraz-manganese.—*Verticillium fungicola*.—*Agaricus bisporus*.—Cell wall.—Partial protein inhibition.—Polysaccharide restructuration.

## INTRODUCCIÓN

Los cultivos industriales del hongo Basidiomiceto superior *Agaricus bisporus* (Lange, Imbach) sufren con demasiada frecuencia la enfermedad verticiliosis denominada por los cultivadores «mole seca» del champiñón, producida por el parasitismo del hongo imperfecto Hifomiceto *Verticillium fungicola* (Preuss, Hassebrauk) sobre los carpóforos del citado *A. bisporus*, ocasionando pérdidas millonarias en el sector tanto en nuestro país como en todos los que se dedican a este cultivo. Dicha micosis ha tratado de controlarse introduciendo severas medidas de higiene tanto en las instalaciones como en el personal cultivador, junto con la aplicación rutinaria de diferentes pesticidas. Con estos fines se han utilizado diferentes fungicidas, pero es difícil encontrar sustancias que actúen específicamente sobre el micopatógeno, y que no afecten al menos parcialmente al hospedador, que en este caso particular se trata igualmente de un hongo aunque perteneciente a otro grupo taxonómico más evolucionado.

nado. Además el uso indiscriminado de tales fungicidas está ocasionando pérdidas paulatinas de actividad frente al patógeno por la producción de diferentes tipos de resistencias (1, 2, 3). La introducción del procloraz en 1983 para combatir *V. fungicola* aportó no sólo un buen control de la verticiliosis sino también un aumento significativo de la cosecha de champiñones sanos (4, 5), de ahí que su empleo se generalizara, con la consiguiente aparición de nuevas resistencias así como con el incremento paulatino de las dosis efectivas (Tabla 1) aunque, en la actualidad, todavía sigue siendo el producto más utilizado para el control del micopatógeno (6).

TABLA 1. *Distintas DL<sub>50</sub> de procloraz-manganeso de tres cepas de Verticillium fungicola en relación con su origen y año de su aislamiento*

Cepas <i>V. fungicola</i>	Año de aislamiento	DL <sub>50</sub> (mg/L)
CBS	1969	0,57
CIES 210	1992	1,71
CIES 100	2000	3,99

*La cepa CBS procede del Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holanda) y las cepas CIES han sido aisladas en el Centro de Investigación, Experimentación y Servicios del Champiñón, Quintanar del Rey, Cuenca, España.*

El procloraz (Figura 1), (N,propil-N(2(2,4,6, triclórofenoxi)-etil)imidazol-1,carboxamida en forma de complejo de manganeso penetra en el interior celular de los hongos, habiendo sido descrito por su modo de acción como inhibidor de la biosíntesis de ergosterol (7, 8, 9) al bloquear la desmetilación del C-14 del lanostenol en su paso a ergosterol, junto con otros posibles lugares de actuación, como la inhibición parcial de la síntesis de proteínas, por lo que se le considera un «fungicida multipuntual» (7). Este fungicida, bajo la denominación de «Sporgon» ha sido autorizado en España y otros países europeos para su aplicación en el cultivo de champiñón en forma de tres dosis preventivas, dejando un plazo de seguridad mínimo de dos días para la posterior recolección de los correspondientes carpóforos.

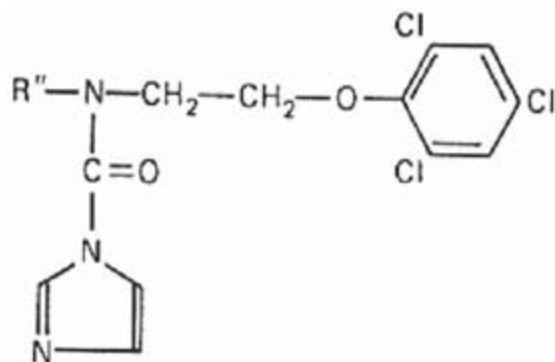


FIGURA 1. Estructura química del procloraz.

El hecho de que el micoparásito *V. fungicola* sólo sea capaz de infectar los champiñones (micelio agregado) del hospedador *A. bisporus* pero no su correspondiente micelio vegetativo, cuyas paredes celulares difieren entre sí significativamente (10, 11), nos muestra el importante papel que desempeña la pared celular de los organismos implicados en este tipo de procesos de parasitismo. Por otra parte, se ha podido demostrar que en la infección de los carpóforos de *A. bisporus*, el micoparásito secreta las enzimas hidrolíticas necesarias para digerir *in vivo* las paredes celulares del micelio agregado, penetrando inter- e intracelularmente hasta producir claras zonas de lisis en las hifas del hospedador, con la consiguiente muerte celular del mismo (12). Tales enzimas de *V. fungicola* son capaces de digerir también *in vitro* las paredes celulares aisladas de los carpóforos de *A. bisporus* (13), con lo que se demuestra de nuevo la especificidad de estas paredes celulares como sustrato de las correspondientes enzimas hidrolíticas. Pero sin embargo *in vivo* el micelio vegetativo de *A. bisporus* no manifiesta la digestión enzimática de sus paredes celulares por dichos enzimas de *V. fungicola*, y por tanto no aparece la infección en este último micelio, mientras que, por el contrario, tales enzimas *in vitro*, sí degradan las citadas paredes celulares aisladas (14), lo que implica la existencia de otros mecanismos adicionales, además de los enzimáticos ya citados, para que la infección se desarrolle y manifieste de forma evidente.

Estudios realizados en otros tipos de micoparasitismo (15, 16) han mostrado la necesidad de unas etapas previas a las enzimáticas,



relacionadas con la adhesión y/o el reconocimiento entre ambos organismos. En estos procesos tan selectivos la estructura química de las correspondientes paredes celulares del hospedador y del parásito vuelve a jugar un papel primordial de tal manera que, determinados componentes de ambas paredes celulares como las proteínas hidrofobinas presentes tanto en *V. fungicola* (17) como en ambos micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* (18, 19), junto con el mucílago de este último organismo (10, 11) han mostrado ser los responsables del contacto o adhesión inespecíficos que tienen lugar como primera etapa (20). A continuación, un heteropolisacárido de las paredes celulares del micoparásito, concretamente el glucogalactomanano de *V. fungicola* (21), que presenta una afinidad altamente específica frente a una proteína lectina asociada a las paredes celulares de los carpóforos de *A. bisporus* (22), reconoce y se une específicamente con ella, con lo que se desencadena la subsiguiente señalización molecular que culmina con la digestión enzimática de las paredes celulares de los carpóforos, fase evidente de la verticiliosis.

Una vez establecida la importancia de determinados componentes de la estructura química de las paredes celulares tanto del micopatógeno como del hospedador —«moléculas diana»— para el desarrollo de la verticiliosis del champiñón (23), el efecto inhibitorio producido por el fungicida procloraz-manganeso sobre dicha micosis debe de reflejarse de alguna forma sobre la estructura química de las envolturas celulares implicadas.

Desde el punto de vista de protección de las cosechas vegetales frente a la infección por los hongos fitopatógenos, el procloraz-manganeso ha sido clasificado como fungicida no-sistémico o pobremente sistémico por su baja penetración en las células de los hospedadores vegetales tratados habitualmente (24), y de ahí su uso tan extensivo. Pero al darse la circunstancia de que en el caso de la verticiliosis del champiñón el organismo hospedador *A. bisporus* no se trata de un vegetal sino también de otro hongo, como su correspondiente micopatógeno *V. fungicola*, el efecto del fungicida tiene que manifestarse también sobre dicho hospedador, teniendo bien presente además que tal hongo hospedador es objeto de cultivo para la alimentación humana.

Como las paredes celulares de ambos organismos han sido objeto de estudio detallado para llegar a desentrañar los mecanismos ce-

lulares y moleculares de la verticiliosis (10, 11, 20), el efecto del procloraz-manganeso sobre tales envolturas celulares nos puede conducir a poder explicar por una parte, la diferente patogeneidad experimental de ciertas cepas salvajes de *V. fungicola* aisladas después del tratamiento rutinario del fungicida y por otra, a comprobar el alcance del empleo del procloraz-manganeso sobre *A. bisporus* como organismo cultivado para la alimentación humana, y evitar los posibles efectos negativos, tanto en cuanto a su producción como en sus características agronómicas y nutricionales. A este respecto se debe hacer constar que, estudios precedentes realizados sobre la administración oral de procloraz-manganeso a ratas han mostrado su total metabolización y excreción (25, 26).

### **EFFECTO DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-MANGANESO SOBRE LAS PAREDES CELULARES DEL MICELIO DEL MICOPATÓGENO *VERTICILLIUM FUNGICOLA***

El control de los hongos mediante productos químicos es un problema que entraña gran dificultad debido a que de una manera general los micelios fúngicos, dada su poca uniformidad, presentan propiedades ilimitadas para regenerar a partir de un fragmento mínimo de hifa superviviente después de cualquier tratamiento químico inhibitorio. Por otra parte la diferente composición y estructura químicas de las paredes celulares fúngicas a lo largo de su correspondiente ciclo biológico (micelios vegetativos y agregados) hace que la penetración del fungicida al interior celular sea diferente en cada caso.

Los estudios realizados sobre el modo de acción del procloraz-manganeso a su  $DL_{50}$  sobre las paredes celulares de *V. fungicola* (27, 28) han mostrado que el efecto más inmediato producido por el fungicida sobre las citadas envolturas celulares es una inhibición parcial de la síntesis de sus proteínas compensada en parte por un aumento de los carbohidratos neutros totales. El estudio más detallado de la estructura química de estos carbohidratos mediante cromatografía gas-líquido (CGL) asociada a espectrometría de masas (EM) después de realizar su metilación e identificados como glucanos y glucogalactomananos (21), muestra que el fungicida produce una

reestructuración parcial cuali- y cuantitativa de ambos tipos de polisacáridos (Figura 2), perdiendo parte de sus ramificaciones los glucanos, y disminuyendo la proporción de glucosa junto con un aumento de las cadenas laterales terminales de galactosa unidas al esqueleto de manosa en los glucogalactomananos (27, 28). Paralelamente una de las proteínas de estas paredes celulares de *V. fungicola*, inhibidas parcialmente por la acción del procloraz-manganeso, ha podido ser identificada como hidrofobina (17), demostrándose mediante estudios de microscopía electrónica de transmisión (27), su disminución progresiva en la superficie de las paredes celulares de las hifas.

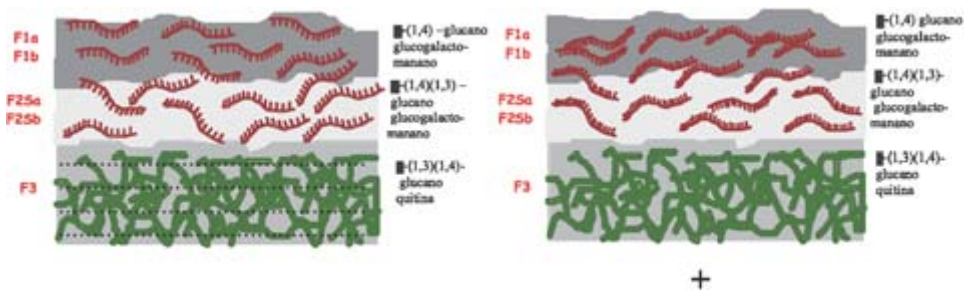


FIGURA 2. *Esquemas comparativos de las redes polisacáridicas estructurales de las paredes celulares del micelio de Verticillium fungicola en ausencia y presencia del fungicida.*

Estas modificaciones químicas estructurales de los polisacáridos, especialmente de los glucogalactomananos de *V. fungicola*, junto con la disminución de la proteína hidrofobina, producidas por el efecto del procloraz-manganeso, afectan claramente tanto al proceso de contacto inespecífico entre el hospedador y el micopatógeno (20), como al de reconocimiento y unión específicos entre ambos organismos, previos al desencadenamiento evidente de la infección (22, 29, 30). Por una parte, la menor proporción de la proteína hidrofobina debe afectar parcialmente al citado contacto inespecífico, con el consiguiente efecto positivo frente a la verticiliosis, pero lo que es más importante, en el reconocimiento específico entre las «moléculas diana», el glucogalactomanano de *V. fungicola* y la lectina de *A. bisporus*, se produce un aumento de afinidad entre las mismas (22) debido al incremento de las cadenas laterales termina-

les de galactosa del glucogalactomanano, que son las que reconocen y se unen específicamente a la lectina. De esta forma el fungicida parece estar produciendo sobre *V. fungicola* efectos contrapuestos, al inhibir parcialmente la adhesión o el contacto inespecífico, que corresponde al efecto que se busca, y al mismo tiempo incrementando, también parcialmente, el reconocimiento y unión específicos entre las «moléculas diana» del micoparasitismo, el glucogalactomanano y la lectina citados (22). Este último efecto explica, al menos en parte, el aumento de un tipo de resistencia de *V. fungicola* frente al procloraz-manganeso, que va en paralelo con el incremento progresivo necesario de las dosis a utilizar para llegar a controlar la verticiliosis (Tabla 1).

A la vista de todos estos hallazgos se hace necesario, en un futuro inmediato, desarrollar estrategias alternativas (23) para controlar la micosis objeto de estudio, eliminando el uso rutinario del procloraz-manganeso así como, de forma general, el de otros fungicidas químicos empleados habitualmente en agricultura, debido al coste medioambiental que conlleva la aplicación de tales pesticidas.

**EFECTO DEL FUNGICIDA PROCLORAZ-MANGANESO  
SOBRE LAS PAREDES CELULARES DE LOS MICELIOS  
VEGETATIVO Y AGREGADO DEL HOSPEDADOR**  
*Agaricus bisporus*

Los experimentos realizados sobre los cultivos industriales de champiñón en ausencia y presencia de procloraz-manganeso en sus dosis  $DL_{50}$  y  $DL_{50} \times 1000$  determinadas sobre el micelio vegetativo de *A. bisporus*, han mostrado un efecto progresivo del fungicida sobre los carpóforos en relación con la cantidad utilizada. Cuando se utiliza la  $DL_{50}$  no se afectan prácticamente, ni la producción de los carpóforos ni las características agronómicas de los mismos, aunque ya se pueden detectar diferencias significativas en el análisis químico estructural de las paredes celulares de las hifas que conforman tal micelio agregado, como describiremos seguidamente. Si la dosis utilizada es la  $DL_{50} \times 1000$  (muy próxima a la dosis agronómica recomendada como preventiva de la verticiliosis en los cultivos comerciales) la producción industrial se inhibe entre un 2,43 y un 3,14%

(Figura 3), la superficie de los carpóforos muestra ligeras variaciones en su textura, y las correspondientes paredes celulares reestructuran determinados componentes polisacáridicos (30).



FIGURA 3. *Cultivo comercial de champiñón en ausencia y presencia de Procloraz-Mn en su dosis  $DL_{50} \times 1000$ . Se observa el efecto inhibitorio producido por el fungicida en tres recipientes frente al control sobre el inicio de la primer florada de champiñón, que se llegará a recuperar posteriormente al final de dicha florada, pero sin alcanzar al testigo.*

En relación con la estructura química de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus*, la acción del procloraz-manganeso en su correspondiente  $DL_{50}$  es, en parte, semejante al efecto descrito sobre las paredes celulares de *V. fungicola*, es decir, una inhibición parcial de la síntesis de proteínas, pero en este caso compensada por un ligero aumento de los carbohidratos aminados (28), a diferencia de los carbohidratos neutros en el micopatógeno. El análisis estructural de los polisacáridos afectados por el fungicida y deducido de los estudios de CGL y EM refleja la reestructuración cuali- y cuantitativa preferente de los heteroglucanos constituyentes de las fracciones FI, FII y FIII de las paredes celulares del micelio vegetativo de *A. bisporus* (Figura 3), produciendo un enriquecimiento del componente mayoritario, la glucosa, por la desaparición de la manosa

y/o de la xilosa (en FII y FIII), junto con significativas variaciones en sus correspondientes enlaces glicosídicos, lo que se traduce en una tendencia de dichos polisacáridos a hacerse más ramificados (30).

Estudios paralelos realizados sobre las paredes celulares del micelio agregado de *A. bisporus* han puesto de manifiesto igualmente un efecto más predominante del procloraz-manganeso sobre determinadas fracciones heteroglucánicas (FI, FII y FIV) originando una cierta disminución de la glucosa compensada por un aumento de la manosa o de la xilosa (en FI y FII). Estas variaciones cuali- y cuantitativas de los monosacáridos constituyentes de tales fracciones (Figura 4), se ven igualmente reflejadas en los tipos de enlaces sacarídicos que las conforman, según se deduce de los estudios realizados mediante CGL-EM, dando lugar igualmente en estas paredes celulares, a un claro incremento de las ramificaciones de dichos polisacáridos (30).

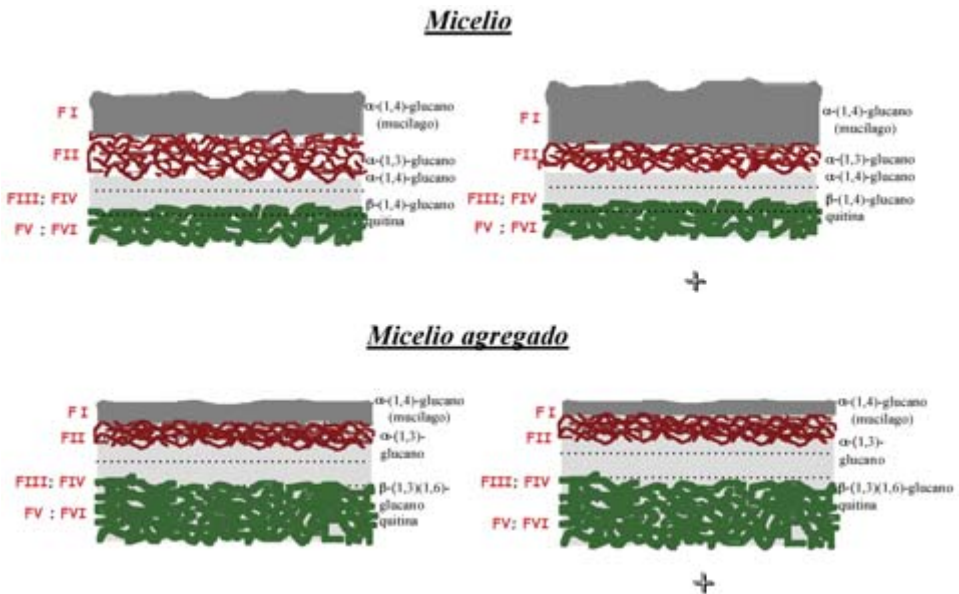


FIGURA 4. Esquemas comparativos de las redes polisacáridicas estructurales de las paredes celulares de los micelios vegetativo y agregado de *Agaricus bisporus* en ausencia y presencia del fungicida.



Las variaciones cuantitativas detectadas en el análisis químico de las proteínas de las paredes celulares de los micelios vegetativo y agregado de *A. bisporus* por efecto del fungicida no han podido ser visualizadas mediante microscopía electrónica de transmisión, como en el caso de *V. fungicola*, debido a que el mucílago, red polisacáridica que se encuentra situada en la superficie externa de las dos clases de paredes celulares, enmascara las posibles variaciones ultraestructurales que se hubieran podido producir en las respectivas proteínas hidrofobinas, localizadas dentro de dicha red estructural externa de ambas paredes celulares (29).

### CONCLUSIONES FINALES

El primer efecto detectado por el uso rutinario del fungicida procloraz-manganeso sobre los cultivos industriales de champiñón es una ligera inhibición de la producción de carpóforos en relación con la dosis empleada. En presencia de la  $DL_{50}$  del fungicida no se produce variación aparente alguna en la producción de dichos cultivos industriales, ni en la morfología de los ejemplares, y sin embargo con la  $DL_{50} \times 1000$ , cantidad muy próxima a la dosis agronómica actualmente recomendada, se obtienen inhibiciones significativas en la producción de carpóforos, junto con unas ligeras variaciones de la textura en la superficie de los mismos.

El fungicida procloraz-manganeso produce sobre las paredes celulares del micoparásito *V. fungicola* una inhibición parcial de la síntesis de las proteínas y una reestructuración paulatina de los carbohidratos, particularmente de los glucogalactomananos. Tales cambios detectados en la estructura química de dichas paredes celulares por efecto del fungicida pueden parecer contradictorios por cuanto, por una parte, disminuyen parcialmente la adhesión o contacto inespecífico entre el micopatógeno y el hospedador, al inhibir parcialmente la proteína hidrofobina (efecto deseado), pero a la vez aumentan el reconocimiento y unión específicos entre las «moléculas diana» de ambos organismos implicados en la verticiliosis. También se puede deducir que *V. fungicola* aparenta ser menos patógeno en aquellas cepas sin tratar o poco tratadas rutinariamente con el fungicida y que presentan menor  $DL_{50}$  mientras que, por el contra-

rio, el procloraz-manganeso parece incrementar la patogeneidad experimental de aquellas cepas que han sufrido un mayor contacto con el fungicida en el tratamiento continuo de los cultivos de champiñón (y que requieren mayor  $DL_{50}$ ), lo que sugiere la formación de diferentes tipos de resistencia según el tiempo sufrido de exposición al procloraz-manganeso.

En cuanto a las paredes celulares de *A. bisporus*, el efecto producido por el fungicida es algo distinto según se trate de las paredes del micelio vegetativo o del agregado, cuya estructura química también muestra diferencias significativas. En el micelio vegetativo el procloraz-manganeso actúa sobre dichas paredes celulares de modo semejante al micelio de *V. fungicola*, inhibiendo parcialmente la síntesis de proteínas y reestructurando ciertos polisacáridos neutros, a diferencia del micelio agregado, en cuyas paredes se produce inhibición parcial de los aminoazúcares, no detectándose efecto significativo sobre las proteínas, pero igualmente modificándose determinados polisacáridos neutros, haciéndose más ramificados.

A la vista de los resultados precedentes, considerando la pérdida creciente de sensibilidad de *V. fungicola* frente al procloraz-manganeso debido a las resistencias progresivas adquiridas, junto con los cambios químicos estructurales producidos en las paredes celulares de *A. bisporus*, que hasta el momento no parecen afectar de forma significativa sus características agronómicas y alimentarias, se hace patente la necesidad de abandonar en un futuro inmediato el uso de este fungicida para controlar la verticiliosis. Se deben desarrollar otras estrategias alternativas a la utilización rutinaria del procloraz-manganeso como preventivo de la citada micosis, por el hecho demostrado de que el fungicida presenta toxicidad frente a ambos hongos -el micopatógeno *V. fungicola* y el hospedador *A. bisporus*- y este último se cultiva para su utilización en la alimentación humana, aunque estudios realizados recientemente sobre la administración oral de procloraz-manganeso a ratas han demostrado que el fungicida se metaboliza y excreta completamente.

El reciente esclarecimiento de las «dianas moleculares» de la verticiliosis del champiñón nos abre el camino para el desarrollo de otras alternativas con objeto de controlar dicha micosis evitando el empleo de procloraz-manganeso, como pueden ser la utilización de



análogos moleculares al glucogalactomanano o la transformación genética de *A. bisporus* en su proteína lectina.

## AGRADECIMIENTOS

Los trabajos experimentales recientes de la autora de esta revisión y que forman parte de la misma han sido financiados por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología y la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) GEA, F. J.; TELLO, J. C. and HONRUBIA, M. (1996): *In vitro* sensitivity of *Verticillium fungicola* to selected fungicides. *Mycopathologia* 136: 133-137.
- (2) BONNEN, A. M. and HOPKINS, C. (1997): Fungicide resistance and population variation in *Verticillium fungicola*, a pathogen of the button mushroom, *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 101: 89-96.
- (3) GEA, F. J.; NAVARRO, M. J. and TELLO, J. C. (2005): Reduced sensitivity of the mushroom pathogen *Verticillium fungicola* to prochloraz-manganese *in vitro*. *Mycol. Res.* 109: 741-745.
- (4) FLETCHER, J. T. (1981): The control of bubble diseases of *Agaricus bisporus* (Lange) Imbach. *Mushroom Sci.* 11: 597-604.
- (5) GANDY, D. G. and SPENCER, D. M. (1981): Fungicide evaluation for control of dry bubble, caused by *Verticillium fungicola*, on commercial mushroom strains. *Scientia Horticulturae* 14: 107-115.
- (6) FLETCHER, J. T. (1992): Mushrooms-fungicides and disease control. *Mushroom J.* 506: 19-21.
- (7) SIEGEL, M. R. (1981): Sterol-inhibiting fungicides: Effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Dis.* 65: 986-989.
- (8) LEROUX, P. (1991): Résistance des champignons phytopathogènes aux fongicides. *Phytoma* 434: 20-26.
- (9) BARBERA, C. (1994): Principales grupos de fungicidas. Mecanismos de acción. *Phytoma España* 62: 7-10.
- (10) GARCÍA MENDOZA, C.; AVELLÁN, M. A.; SÁNCHEZ, E. and NOVAES-LEDIEU, M. (1987): Differentiation and wall chemistry of *Agaricus bisporus* vegetative and aggregated mycelia. *Arch. Microbiol.* 148: 68-71.
- (11) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C. and NOVAES-LEDIEU, M. (1996): New contributions to the wall polysaccharide structure of vegetative mycelium and fruit body cell walls of *Agaricus bisporus*. *Microbiología SEM* 12: 599-606.
- (12) DRAGT, J. W.; GELLS, F. P.; DE BRUIJN, C. and VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. (1996): Intracellular infection of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* by the mycoparasite *Verticillium fungicola* var. *fungicola*. *Mycol. Res.* 100: 1082-1086.

- (13) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; GALÁN, B. and NOVAES-LEDIEU, M. (1997): Enzymic activity of the mycoparasite *Verticillium fungicola* on *Agaricus bisporus* fruit body cell walls. *Microbiology* 143: 2999-3006.
- (14) CALONJE, M.; GARCÍA MENDOZA, C.; PÉREZ CABO, A.; BERNARDO, D. and NOVAES-LEDIEU, M. (2000): Interaction between the mycoparasite *Verticillium fungicola* and the vegetative mycelial phase of *Agaricus bisporus*. *Mycol. Res.* 104: 988-992.
- (15) INBAR, J. and CHET, I. (1994): A new isolated lectin from the plant pathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*: purification, characterization and role in mycoparasitism. *Microbiology* 140: 651-657.
- (16) INBAR, J. and CHET, I. (1996): The role of lectins in recognition and adhesion of the mycoparasitic fungus *Trichoderma* spp. to its host. *Adv. Exp. Med. Biol.* 408: 229-321.
- (17) CALONJE, M.; BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M. and GARCÍA MENDOZA, C. (2002): Properties of a hydrophobin from the mycoparasitic fungus *Verticillium fungicola*. *Can. J. Microbiol.* 48: 1030-1034.
- (18) LUGONES, L. G.; BOSSCHER, J. S.; SCHOLTMAYER, K.; DE VRIES, O. M. and WESSELS, J. G. H. (1996): An abundant hydrophobin (ABH1) forms hydrophobic rodlet layers in *Agaricus bisporus* fruiting bodies. *Microbiology* 142: 1321-1329.
- (19) LUGONES, L. G.; WÖSTEN, H. A. B. and WESSELS, J. G. H. (1998): A hydrophobin (ABH3) specifically secreted by vegetative growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology* 144: 2345-2353.
- (20) GARCÍA MENDOZA, C.; BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A. and NOVAES-LEDIEU, M. (2003): Mechanisms involved in the *Verticillium fungicola* mycoparasitism on *Agaricus bisporus* fruit bodies: *Verticillium* disease or «dry bubble» of cultivated mushrooms. En: *Recent Research Developments in Microbiology*, Vol. 7, Part I. S. G. Pandalai (ed.), Research Signpost, Trivandrum, India, pp. 269-278.
- (21) CALONJE, M.; NOVAES-LEDIEU, M.; BERNARDO, D.; AHRAZEM, O. and GARCÍA MENDOZA, C. (2000): Chemical components and their locations in the *Verticillium fungicola* cell wall. *Can. J. Microbiol.* 46: 101-109.
- (22) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M. and GARCÍA MENDOZA, C. (2004): *Verticillium* disease or «dry bubble» of the cultivated mushrooms: the *Agaricus bisporus* lectin recognizes and binds the *Verticillium fungicola* glucogalactomannan. *Can. J. Microbiol.* 50: 729-735.
- (23) GARCÍA MENDOZA, C. (2005): El micoparasitismo de *Verticillium fungicola* sobre los carpóforos de *Agaricus bisporus*: la verticiliosis o «mole seca» del champiñón. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* 71: 571-586.
- (24) HASSALL, K. A. (1990): The biochemistry and uses of pesticides. 2<sup>nd</sup> edn. VCH, Weinheim.
- (25) NEDHAM, D. and CHALLIS, I. R. (1991): The metabolism and excretion of prochloraz, an imidazole-based fungicide, in the rat. *Xenobiotica* 21: 1473-1482.
- (26) LAIGNELET, L.; RIVIERE, J. L. and LHUGUENOT, J. C. (1992): Metabolism of an imidazole fungicide (Prochloraz) in the rat after oral administration. *Food Chem. Toxicol.* 30: 575-583.

- (27) BERNARDO, D.; NOVAES-LEDIEU, M.; PÉREZ CABO, A.; GEA ALEGRÍA, F. J. and GARCÍA MENDOZA, C. (2002): Effect of the fungicide Prochloraz-Mn on the cell wall structure of *Verticillium fungicola*. *Int. Microbiol.* 5: 121-125.
- (28) GARCÍA MENDOZA, C.; BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A. and NOVAES-LEDIEU, M. (2004): Bioquímica del empleo de Prochloraz-Mn: modificaciones estructurales en las paredes celulares de los micelios de *Agaricus bisporus* y *Verticillium fungicola* inducidas por el fungicida. En: *Avances en la tecnología de la producción comercial del champiñón y otros hongos cultivados 2*. Patronato de Promoción Económica. Diputación Provincial de Cuenca, pp. 189-201.
- (29) BERNARDO LÓPEZ, M. D. (2003): Bases celulares y moleculares de la verticilio-sis (producida por *Verticillium fungicola*) de los cultivos industriales de champiñón (*Agaricus bisporus*) y efecto del fungicida Prochloraz-Mn. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, pp. 123 y 127.
- (30) BERNARDO, D.; PÉREZ CABO, A.; NOVAES-LEDIEU, M.; PARDO, J. and GARCÍA MENDOZA, C. (2004): Comparative studies of the effect produced by the fungicide Prochloraz-Mn on *Agaricus bisporus* vegetative mycelium and fruit body cell walls. *Int. Microbiol.* 7: 277-281.